

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008890699

WPI Acc No: 1992-017968/199203

XRAM Acc No: C92-007768

Detecting target nucleic acid - by hybridising labelled target nucleic acid with immobilised single stranded nucleic acid

Patent Assignee: WAKUNAGA SEIYAKU KK (WAKT)

Inventor: YAMANE A

Number of Countries: 009 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 466367	A	19920115	EP 91305837	A	19910627	199203 B
JP 5192198	A	19930803	JP 91182035	A	19910626	199335
EP 466367	B1	19950823	EP 91305837	A	19910627	199538
DE 69112309	E	19950928	DE 612309	A	19910627	199544
			EP 91305837	A	19910627	
<i>Con</i> <u>US 5741638</u>		19980421	US 91722673	A	19910628	199823
			US 934572	A	19930114	
			US 94358995	A	19941219	
JP 10179199	A	19980707	JP 91182035	A	19910626	199837
			JP 97355194	A	19910626	
JP 2792757	B2	19980903	JP 91182035	A	19910626	199840
JP 2972685	B2	19991108	JP 91182035	A	19910626	199952
			JP 97355194	A	19910626	

Priority Applications (No Type Date): JP 90170684 A 19900628

Cited Patents: 00 23572600; 00 40778900; 02 15607400; 8705334

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 466367	A		29		
Designated States (Regional): CH DE FR GB IT LI NL					
JP 5192198	A	15		C12Q-001/68	
EP 466367	B1	E	19	C12Q-001/68	
Designated States (Regional): CH DE FR GB IT LI NL					
DE 69112309	E			C12Q-001/68	Based on patent EP 466367
US 5741638	A	36		C12Q-001/68	CIP of application US 91722673
					Cont of application US 934572
JP 10179199	A	15		C12Q-001/68	Div ex application JP 91182035
JP 2792757	B2	17		C12Q-001/68	Previous Publ. patent JP 5192198
JP 2972685	B2	14		C12Q-001/68	Div ex application JP 91182035
					Previous Publ. patent JP 10179199

Abstract (Basic): EP 466367 A

A process for detecting a nucleic acid is claimed comprising: (a) labelling a target nucleic acid to be detected; (b) immobilising single stranded nucleic acids specifically hybridisable with the target nucleic acid on a solid support to place the single stranded nucleic acid under such a condition that a strand complementary to the single stranded nucleic acid is absent; (c) hybridising the target nucleic acid labelled in step (a) with the single stranded nucleic acid immobilised in step (b) and (d) detecting, simultaneously with or after step (c), the target nucleic acid through the utilisation of a label present in the target nucleic acid.

ADVANTAGE - The process enables a target nucleic acid to be specifically detected with high sensitivity and efficiency. The process is rapid and can be automated. (29pp Dwg.No.0/5

Abstract (Equivalent): EP 466367 B

A process for detecting a nucleic acid comprising the steps of: (i) labelling a target nucleic acid to be detected; (ii) immobilising single stranded nucleic acids which are specifically hybridisable with the target nucleic acid, on a solid support to place said single stranded nucleic acid under such a condition that a strand complementary to said single stranded nucleic acid is absent; (iii) hybridising said target nucleic acid labelled in step (i) with said single stranded nucleic acid immobilised in step (ii) and washing said solid support; and (iv) detecting, simultaneously with or after step (iii), said target nucleic acid through the utilization of a label present in said target nucleic acid, characterised in that said single stranded nucleic acid is derived from either a phage or a composite vector comprising a phage and a plasmid and said single stranded nucleic acid further has a plurality of sequences hybridisable with said target nucleic acid, said sequences being repeated 5 to 200 times.

Dwg.0/6

Title Terms: DETECT; TARGET; NUCLEIC; ACID; HYBRID; LABEL; TARGET; NUCLEIC; ACID; IMMOBILISE; SINGLE; STRAND; NUCLEIC; ACID

Derwent Class: B04; D16; P34

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): A61L-003/00; C12N-015/09

File Segment: CPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C3; B04-B04A1; B04-B04A6; B05-B01N; B11-C07B2; B12-K04A1; D05-H09; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M750 M903 N102 Q233 V753

03 M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V500 V540 V752 V802 V813

Chemical Fragment Codes (M2):

02 B515 B701 B713 B720 B815 B831 G013 G100 H3 H341 M280 M320 M411 M430 M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 N102 P831 Q233 Q505 R03050-D R03050-M

Chemical Fragment Codes (M6):

04 M903 Q233 R511 R514 R521 R623 R624 R639

Specific Compound Numbers: R03050-D; R03050-M

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-192198

(43) 公開日 平成5年(1993)8月3日

(51) Int.Cl.⁶

C 12 Q 1/68

識別記号 庁内整理番号

ZNA A 8114-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4(全15頁)

(21) 出願番号 特願平3-182035

(22) 出願日 平成3年(1991)6月26日

(31) 優先権主張番号 特願平2-170684

(32) 優先日 平2(1990)6月28日

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(71) 出願人 000250100

湧永製薬株式会社

大阪府大阪市中央区伏見町4丁目2番14号

(72) 発明者 山根明男

広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬
株式会社内

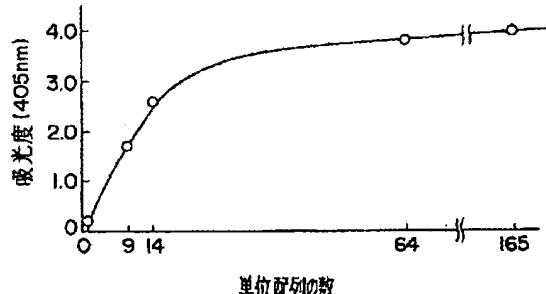
(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 核酸の検出法

(57) 【要約】

【目的】 目的核酸を簡易かつ迅速に、高感度で検出可能な方法を提供する。

【構成】 検出しようとする目的核酸と相補的な一本鎖核酸を、固定担体に固定しそれによってこの一本鎖核酸に対する相補鎖が存在しない状態におき、この固定された一本鎖核酸と、標識した試料中の目的核酸とをハイブリダイゼーションさせ、目的核酸を検出する。固定される一本鎖核酸として、目的核酸とハイブリダイズする可能な配列を複数個含むものを用いることにより、より高感度の核酸の検出が可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の工程(イ)～(二)からなることを特徴とする、核酸の検出法。

- (イ) 検出すべき目的核酸を標識化する工程。
- (ロ) 目的核酸と特異的にハイブリダイズ可能な一本鎖核酸を、固定担体に固定化しそれによって該一本鎖核酸に対する相補鎖が存在しない状態におく工程。
- (ハ) 工程(イ)で標識した目的核酸と、工程(ロ)で固定化された一本鎖核酸とをハイブリダイゼーション反応させる工程。

(二) 工程(ハ)と同時にまたはその後、目的核酸に存在する標識を利用して、目的核酸を検出する工程。

【請求項2】工程(イ)で標識される目的核酸が、検体由来の核酸に相当する合成核酸または検体由来の核酸と相補的な合成核酸である、請求項1記載の核酸の検出法。

【請求項3】工程(ロ)で固定される一本鎖核酸が、目的核酸と特異的にハイブリダイズ可能な配列を複数個含んでなるものである、請求項1または2記載の核酸の検出法。

【請求項4】工程(ロ)で固定される一本鎖核酸が、目的核酸と特異的にハイブリダイズ可能な配列を5～200個含んでなるものである、請求項1または2記載の核酸の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】【発明の背景】

【産業上の利用分野】本発明は核酸の検出法に関する。さらに詳しくは、検出しようとする目的核酸と相補的な一本鎖核酸を固定担体に固定し、これと、標識した試料中の目的核酸とをハイブリダイゼーションさせることによって目的核酸を検出する方法であり、迅速で機械化が容易な方法である。

【0002】

【従来の技術】核酸の特異的塩基配列を検出するための基本的なハイブリダイゼーション法としては、担体に吸着した核酸と溶液中の核酸とをハイブリダイズする固-液ハイブリダイゼーション法や溶液中の核酸同士をハイブリダイズする液-液ハイブリダイゼーション法がある。
[Anal. Biochem., 169, 1-25 (1988)]。今まで、核酸の検出をより簡易、迅速および高感度にするために上記方法について種々改良が行われている[Anal. Biochem., 169, 1-25 (1988)]。

【0003】その中で、核酸の検出操作の自動化を目的とし、もともと抗体分野で使われているマイクロプレートを利用する方法が考案されている(特開昭第61-219400号公報)。この方法においては、試料中の二本鎖核酸を変性して一本鎖とし、その一本鎖を互いに相補鎖の存在する状況下でマイクロプレートに非特異的吸着により固定化している。それゆえ、固定中に二本鎖にもどるもの、あるいは固定後に二本鎖を形成するものが

あり、実際のハイブリダイゼーションにおいてハイブリダイズ可能なものは固定化されたDNAよりかなり少いと考えられる。また、元来このような固定法ではDNAの吸着量が比較的少く、実際に応用するには検出感度の点で不十分である。

【0004】また、サンドイッチハイブリダイゼーションの捕獲用プローブとして、ポリチミジル酸をマイクロプレートに固定する方法が考案されている[Molecular and Cellular Probes, 3, 189-207 (1989)]。この方法は、光反応において他の核酸塩基より反応性の高いチミジル酸のポリマーを固定することにより、4種の塩基が混じっている場合より吸着量が圧倒的に多い点で有利と言える。しかしながら、この方法の応用は、ポリアデニル酸を捕獲するサンドイッチハイブリダイゼーションに限られており、サンドイッチハイブリダイゼーション固有の性質である操作性の煩雑さおよび系の複雑さによる感度の低下をまぬがれることはできない。

【0005】一方、近年開発された核酸の増幅法は特定の微量の遺伝子を短時間に10万倍以上にも増やすことのできる画期的な方法である(PCR法:特開昭第61-274697号公報)。そして、この方法により増幅された核酸を利用してヒト遺伝子の点突然変異を比較的簡単に検出する方法が考案されている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6230-6234 (1989)]。この方法はリバースドットハイブリダイゼーションと名付けられており、検出しようとする塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチドを化学合成し、それにポリチミジル酸を酵素反応により付加して、ナイロンメンプランに固定化しやすいように工夫している。この方法はオリゴヌクレオチドを効率よくナイロンメンプランに固定する方法としてはすぐれているが、ナイロンメンプランを使う方法自体が検出操作の機械化に向いていない事や、固定化プローブの調製が大量の調製に向いていないなどの欠点がある。

【0006】上記方法は、それぞれに固有の長所があるが、同時に欠点もあり、未だ満足のいく簡易、迅速、高感度を実現する方法は開発されていない。

【0007】【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、今般、目的核酸と相補的な配列を含んだ一本鎖核酸を固定しつつその一本鎖核酸をその核酸に対する相補鎖が存在しない状態において固定担体を用いることによって、目的核酸を簡易かつ迅速に、高感度で検出可能なことを見出だし、本発明を完成した。従って本発明は、目的核酸を簡易かつ迅速に、高感度で検出可能な方法を提供することを目的としている。また本発明は、機械化が容易な目的核酸の検出法を提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明による核酸の検出法は、下記の工程(イ)～(二)からなるものである。

- (イ) 検出すべき目的核酸を標識化する工程。

(口) 目的核酸と特異的にハイブリダイズ可能な一本鎖核酸を、固定担体に固定化しそれによって該一本鎖核酸に対する相補鎖が存在しない状態におく工程。

(ハ) 工程(イ)で標識した目的核酸と、工程(口)で固定化された一本鎖核酸とをハイブリダイゼーション反応させる工程。

(二) 工程(ハ)と同時にまたはその後、目的核酸に存在する標識を利用して、目的核酸を検出する工程。

本発明による核酸の検出法によれば、目的核酸を特異的にかつ高感度で効率良く検出可能であり、また、検出作業の迅速化、簡易化さらには機械化が可能となる。

【0009】[発明の具体的説明]

目的核酸

本発明でいう「検出すべき目的核酸」とは、検出しようとする特異な塩基配列を含むものであって、DNA、RNAいずれであってもよい。本発明を適用し得るこのような核酸は、細菌、ウイルスおよび高等動植物などあらゆる生命体から調製することができる。また、上記核酸は、本発明による検出法を適用する場合、精製されていてもされていてもよい。また、本発明による核酸の検出法にあっては、前記した生命体から得られた核酸のみならず、その核酸を後記するような方法によって増幅し、この検体由来の核酸に相当する合成核酸あるいはこの核酸と相補的な合成核酸を検出すべき核酸として用いてよい。従って、本発明において目的核酸とは、検出すべき検体由来の核酸に加えて、この検体由来の検出すべき核酸に相当する合成核酸、さらにはその核酸と相補的な合成核酸をも含む意味に用いることとする。

【0010】核酸の検出法

工程(1)：目的核酸の標識工程

本発明による核酸の検出法においては、まず、検出しようとする目的核酸を標識化する。標識化の方法としては、例えば、①目的核酸に標識物を直接導入する方法、②標識化されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用して目的核酸に相当する核酸あるいは目的核酸と相補的な核酸を合成する方法、③標識化された単位核酸の存在下、オリゴヌクレオチドプライマーを使用して目的核酸に相当する核酸あるいは目的核酸と相補的な核酸を合成する方法などが具体例としてあげられる。

【0011】①の目的核酸に標識物を直接導入する方法としては、目的核酸に光反応でビオチン誘導体を導入し酵素を結合したストレプトアビジンで検出する方法(Nucleic Acids Res., 13, 745 (1985))、目的核酸をスルホン化し酵素標識抗スルホン化抗体を用いて検出する方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3466-3470 (1984))などが、操作の簡便性、迅速性の点から好ましい。

【0012】一方、前記②および③の方法としては、特定の核酸配列を増幅する方法(BIO/TECHNOLOGY, 8, 291 (1990))を利用することができます。これらの方針は目的核酸を増幅するという点で特に注目されているが、そ

れのみならず、比較的簡単に目的核酸に相当する合成核酸あるいは目的核酸と相補的な合成核酸を標識化できる点でも利用価値が高い。例えば、PCR法(Science, 230, 1350-1354 (1985))にあっては、標識したプライマーを利用するか、あるいは、標識したモノヌクレオチドトリリン酸を利用することにより、標識された伸長生成物または増幅生成物を得ることができる。また、Qβレプリカーゼを利用する増幅法(BIO/TECHNOLOGY, 6, 1197 (1988))にあっては、同様に標識したモノヌクレオチドトリリン酸を利用することによって標識された伸長生成物または増幅生成物を得ることができる。また、前述した以外の核酸増幅法においても、伸長反応または増幅反応によって取り込まれるモノヌクレオチドトリリン酸やオリゴヌクレオチドを標識しておくことによって伸長生成物または増幅生成物を標識することができる。特に②の方法が本発明にあっては好ましい。

【0013】ここで使用する標識物質とは、ハイブリダイゼーション操作後にこの物質を検出し得るものであるならば、放射性、非放射性を問わない。取扱いの容易性、保存性、廃棄処理等から、また本発明の効果を最もよく享受するものとして、非放射性の標識物質が好ましい。

【0014】非放射性の標識物質としては、例えばビオチン、2, 4-ジニトロフェニル基、ジゴキシゲニン等のハプテン、フルオレセインおよびその誘導体(例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)等)、ローダミンおよびその誘導体(例えば、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)、テキサスレッド等)、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラン(NBDF)およびダンシルなどの蛍光物質あるいはアクリジン等の化学発光物質が挙げられる。これらによりオリゴヌクレオチドを標識する場合は、いずれも公知手段(特開昭59-93098号、特開昭59-93099号各公報参照)により、標識化を行うことができる。また、ヌクレオチド三リン酸を標識する場合は公知手段(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4045 (1983)、特開昭63-152364公報)に準じて行うか、市販品を利用することができます。

【0015】工程(口)：一本鎖核酸の固定化

本工程は、目的核酸と特異的にハイブリダイズ可能な配列を含む一本鎖核酸を固定担体に固定化し、その結果この固定した一本鎖核酸を、その一本鎖核酸に対する相補鎖が存在しない状態におく工程である。

【0016】本発明における一本鎖核酸としては、一本鎖核酸がDNAである場合、たとえば二本鎖核酸を変性して相補分離したものを用いることができる(Nucleic Acids Res., 13, 5457-5468 (1985))。また、DNAポリメラーゼを用いて合成したものを錠型と分離したものでもよい(Anal. Biochem., 162, 130-136 (1987))。さらに、検出しようとする遺伝子を組み込んだM13フ

アージより得られる一本鎖核酸、あるいは、ファージとプラスミドの複合ベクター（例えばpUC118、pBSM13⁺、PUCf1等）より得られる一本鎖核酸を利用することもできる（Methods in Enzymology, 153, 3-34(1987)）。また、一本鎖核酸がRNAの場合、天然由来のRNAのみならず、RNAポリメラーゼなどを利用して試験管内で合成したものでもよい。なお、これらの一本鎖核酸中に含まれる目的核酸と特異的にハイブリダイズ可能な配列以外の塩基配列が、ハイブリダイゼーション反応に不都合な場合には、Messingらの方法（Methods in Enzymology, 101, part C, 20 (1983)）に従って、その部分を除くことができる。

【0017】本発明による別の態様によれば、固定される一本鎖核酸として、その中に目的核酸とハイブリダイズ可能な配列を複数有しているものを用いるのが好ましい。固定化される一本鎖核酸中に目的核酸とハイブリダイズ可能な配列が多く存在していれば、ハイブリダイゼーションの時間を短縮することができ、遺伝子の迅速な検出を行うことができるからである。

【0018】目的核酸とハイブリダイズ可能な配列が複数存在する一本鎖核酸としては、例えば前記ファージDNAあるいはファージとプラスミドの複合ベクターに、目的核酸とハイブリダイズ可能な配列を複数コピー導入し、それから得られる一本鎖核酸を利用するのが好ましい。特に、上記目的核酸とハイブリダイズ可能な配列を5～200コピー導入したベクターから得られる一本鎖核酸を用いるのが好ましい。

【0019】また、ハイブリダイゼーションによって試料中の塩基配列の点変異等の検出を行う場合には、目的核酸とハイブリダイズ可能な配列は比較的短い方が好ましい。

【0020】一般的に、これらの一本鎖核酸を担体に固定するには後記するような方法によるが、固定化方法によっては高い固定化効率を望めない場合がある。しかし、そのような場合であっても、目的核酸とハイブリダイズ可能な配列を複数個含む一本鎖核酸を用いて固定化すれば、目的核酸とハイブリダイズ可能な配列を比較的多く固定化することができる点で有利である。

【0021】また、一般に目的核酸とハイブリダイズ可能な配列からなるオリゴヌクレオチドを担体に結合させた場合、担体への固定に関与した部分は、自由度がなくなるためハイブリダイゼーションに関与できなくなり、ハイブリダイゼーション効率が溶液中に比べて低下することが知られている。しかし、上記一本鎖調製用ベクターを用いて調製した一本鎖核酸を使用した場合、担体への固定に関与していないハイブリダイズ可能な単位配列が多数存在すると考えられ、固定化によるハイブリダイゼーション効率の低下も少ないと考えられ、有利である。

【0022】ただし、伸長反応あるいは增幅反応を利用

して標識化し、その標識化生成物を検出する場合、固定化する一本鎖核酸は、伸長反応または增幅反応に利用したプライマーと相同意の低いものが好ましい。例えば、前述のPCR法においては、遺伝子増幅に用いるプライマーは増幅反応終了後も未反応のまま溶液中に存在する場合が多く、このプライマーと一本鎖核酸がハイブリダイゼーションしないように一本鎖核酸の配列を選定することが必要である。そのような注意は他の遺伝子増幅法においても同様である。

【0023】これらの一本鎖核酸を固定化する担体としては、核酸が非特異的に吸着しうるもの、あるいは、官能基が導入できその官能基と核酸との間で共有結合できるものであればいずれの材質のものも、また、いずれの形状のものも利用可能である。その具体例としては、いわゆるポリマー製のマイクロプレート、チューブ、ビーズ形状のものがあげられる。特にマイクロプレートを用いるのが、その機械化の容易性から好ましい。

【0024】前記した一本鎖核酸をこれらの担体に固定化する方法としは、まず化学結合法が挙げられる（Nucleic Acids Res., 15, 5373-5390 (1987)）。化学結合によって核酸を固定化する方法の具体例としては、アミノ基を導入した担体と核酸をグルタルアルデヒドのような架橋剤を用いて両者を結合させる方法が挙げられる。また、核酸に官能基（例えばトランスアミネーション反応により1級のアミノ基）を導入し、適当な架橋剤を用いて担体上に導入された官能基と結合させることも有効である。

【0025】また、吸着などの非特異的結合によって核酸を直接担体に固定することもできる。特に担体がマイクロプレートである場合は、紫外線照射またはMgCl₂の添加により吸着効率をあげることが可能である（特開昭61-219400号公報）。さらに、核酸とタンパク質を適当な方法によって化学結合あるいは非特異的に吸着させ、そのタンパク質と担体との非特異的吸着を利用して固定化する方法なども有効である。

【0026】以上のようにして一本鎖核酸を固定担体に固定化し、それによってこの一本鎖核酸に対する相補鎖が存在しない状態が実現される。

【0027】工程（ハ）：ハイブリダイゼーション反応
本工程は、工程（イ）で標識した目的核酸と、工程（ロ）で固定化された一本鎖核酸とをハイブリダイゼーション反応させる工程である。

【0028】ハイブリダイゼーション反応の条件は、目的核酸および担体に固定化された一本鎖核酸の組み合わせに応じて適宜選択、決定されてよい。例えば、本工程でのハイブリダイゼーション反応は、基本的には、従来の膜を用いるハイブリダイゼーションと同様に行なうことができる（B. D. Hames and S. J. Higgins, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press (1985)）。

【0029】ある種の担体ではハイブリダイゼーションの条件によって核酸との非特異的吸着が弱い場合があるが、そのような場合には、プレハイブリダイゼーション反応の操作を省くことができる。また、同じ理由からハイブリダイゼーションの溶液組成も簡素化されてよい。さらに、長時間ハイブリダイゼーション反応を行なうと固定化した一本鎖核酸が遊離する場合があるので、ハイブリダイゼーション反応の時間はできるだけ短縮できるような条件が好ましい。

【0030】ハイブリダイゼーション反応後の洗浄操作も従来法とほぼ同様に行なうことができる。この場合、操作の簡略性を考えると、出来るだけ室温で過剰の試薬などが除ける条件が好ましい。

【0031】ただし、点変異の検出を行う場合は、洗浄条件を注意深く検討しなければならない。また、そのような場合、相補的な部分の塩基組成によらないでその長さのみに依存するような条件 [Nucleic Acids Res., 16, 4637-4650 (1988)] を利用するのもよい。

【0032】工程(二)：検出工程

本工程は、工程(八)と同時にまたはその後、目的核酸に存在する標識を利用して、目的核酸を検出する工程である。

【0033】本工程における検出操作は、目的核酸に存在する標識の種類に応じて適宜選択され、決定されてよい。

【0034】ここで、目的核酸に存在する標識が直接検出可能なものである場合、すなわち標識が例えばラジオアイソトープ、蛍光物質、色素などである場合には、標識核酸が固相に結合した状態で検出操作を行なうかまたは標識物を核酸と結合したまま、あるいは標識物を核酸から切り放した状態で溶液中に遊離させた後、その標識に応じた方法によって検出操作を行なう。また、標識が間接的に検出可能なものである場合、すなわち標識が例えばビオチン、ハプテンなどの特異的結合反応のリガンドである場合、一般的にそれらの検出に用いられているように、直接信号を発生する標識あるいは信号を発生する反応を触媒する酵素を結合した受容体(たとえばアビジョンまたは抗体)を使用して検出操作を行う。なお、これらの受容体は、工程(八)であらかじめ添加しておいてもよく、この場合、検出工程の一部、すなわちリガンドと受容体の特異的結合反応は、工程(八)と同時に行なうことができ、全工程を更に簡単にできる。

【0035】

【実施例】

【実験例】本発明を以下の実験例によって更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実験例に限定されるものではない。なお、以下の実験例における遺伝子工学的手法は、マニアティスらのモレキュラークロニング第2版 [Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に従って行った。また、オリゴヌクレオチドはアプライド

バイオシステム社の自動合成機モデル381Aを用いて行い、一般的手法 [Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (1984)] により、脱保護および精製して使用した。また、ビオチン標識オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成の最後にアミノリンクII(商標) (アプライドバイオシステム社製) を付加してアミノ基を導入し、米国特許第4,849,336号公報に記載の方法に従ってビオチンコハク酸イミドエステルと反応して得た。

【0036】実験例1

固定化用一本鎖DNAの調製

直鎖状の一本鎖DNAを得るためにMessingらの方法 [Methods in Enzymology, 101, Part C, 20 (1983)] の変法を利用した。つまり、図1に示す化学合成DNAフラグメントをプラスミドpBSM13⁺ (ストラタジーン社製) のEcoRIと HindIII切断部位の間に挿入し、プラスミドpUPPO1を得た。次に、このプラスミドのHincII切断部位に、ヒトパピローマウィルス16の遺伝子のE6とE7を含む1.8キロベースの断片を挿入してプラスミドpUPPHP16を得た。得られたプラスミドで大腸菌NM522を形質転換し、ヘルパーファージM13K07を用いて、常法に従つて、一本鎖DNAを調製した [Methods in Enzymology, 153, 3-34 (1987)]。さらに、得られた一本鎖DNAを直鎖状にするために、制限酵素EcoRIあるいはBamHIで切断した。

【0037】実験例2

一本鎖DNAのプレートへの固定

実験例1で得られた一本鎖DNAを、10mM Tris・HCl pH7.6、1mM EDTA溶液で100ng/μlの濃度とし、これに4倍容のH₂Oと5倍容の固定化バッファー(1.5M NaCl、0.3M Tris・HCl pH8.0、0.3M MgCl₂)を加えて混和し、マイクロプレート(Dynatech社、Immulon 2、removewell strips、No. 011-010-6302)に1ウェルあたり100μlずつ加えた。プレートはふたをして37℃で16時間放置した。その後、液を除き、37℃で30分間風乾後、ストラタリンカー(商標) 2400(ストラタジーン社製) を用い、500,000μJの光照射を行った。光照射後、洗浄バッファー(1M NaCl、2mM MgCl₂、0.1M Tris・HCl pH9.3、0.1% Tween 20:200μl)で3回洗浄した。プレートをピニールバックに入れてシールし、4℃で保存した。

【0038】実験例3

プレート中でのハイブリダイゼーションと検出

実験例2で得たヒトパピローマウィルス16遺伝子を含む一本鎖DNAを固定したプレートに、ハイブリダイゼーション溶液(5×SSC、5×Denhardt's溶液、0.2%SDS、200μg/ml、サケ精子DNA:100

$1\mu\text{l}$ / ウエル) を加え、更にプローブとして上記ヒトバピローマウィルス 16 の遺伝子の一部に相補的なビオチン標識オリゴヌクレオチド (Bio-ATTGTAATGGGCTCTGTCCG, 20 ng / ウエル) を加え、55°Cで30分間保温した。ハイブリダイゼーション溶液を除き、2×SSC (200 μl / ウエル) で3回洗浄した。これに、ストレプトアビシン-アルカリフェヌルアーティザ溶液 (BRL社のストレプトアビシン-アルカリフェヌルアーティザを 0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.3M NaCl, 2mM MgCl₂, 0.05% (v/v) Triton X-100 : 200 μl / ウエル) で3回洗浄した。洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸溶液 (1M ジエタノールアミン pH 9.8, 0.5mM MgCl₂ : 4 mg / ml : 100 μl / ウエル) を加えて 23°C で 1 時間反応し、405 nm で吸光度を測定した。その結果は、第1表に示される通りである。

【0039】
0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.3M NaCl, 2mM MgCl₂, 0.05% (v/v) Triton X-100 で 1/1000 に希釈 : 100 μl *

* 1 / ウエル) を加え、23°Cで10分間振とうした。反応液を除き、洗浄液 (0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.3M NaCl, 2mM MgCl₂, 0.05% (v/v) Triton X-100 : 200 μl / ウエル) で3回洗浄した。洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸溶液 (1M ジエタノールアミン pH 9.8, 0.5mM MgCl₂ : 4 mg / ml : 100 μl / ウエル) を加えて 23°C で 1 時間反応し、405 nm で吸光度を測定した。その結果は、第1表に示される通りである。

第1表

吸光度 (405nm)	
ヒトバピローマ遺伝子を含む	1.34
一本鎖DNAを固定したプレート	
ヒトバピローマ遺伝子を含まない	0.13
一本鎖DNAを固定したプレート	
DNAを固定していないプレート	0.13

第1表中の数値は、405 nm の吸光度で基質によるバックグラウンドを差し引いた値である。

【0040】実験例4

DNAのプレートへの固定化に及ぼすUV照射の影響

実験例1で得られたプラスミド pUPPHP 16 及びそれから得られる一本鎖DNAを、EcoRIで切断して直鎖状としたものをそれぞれ実験例2と同様にしてプレートに固定した。ただし2本鎖DNAを固定する場合※

※は、固定化バッファーと混和する前に加熱変性した。その後、実験例2と同様にUV照射を行ったものと、行わなかったものの2種類のプレートを作製した。以上のプレートを使用し、実験例3と同様に Bio-ATTGTAATGGGCTCTGTCCG を用いてプレートのハイブリダイゼーション能を調べた。結果は第2表に示される通りである。

【0041】

第2表

	UV照射	UV照射なし
2本鎖DNA	0.51	0.48
一本鎖DNA	1.58	0.56

第2表中の数値は、405 nm の吸光度で基質によるバックグラウンドを差し引いた値である。

【0042】実験例5

一本鎖DNAと2本鎖DNAのプレート固定化後のハイブリダイゼーション能の比較

一本鎖DNAと、2本鎖DNAを変性したものとのプレート固定化後のハイブリダイゼーション能を比較した。一本鎖DNA及び2本鎖DNAは実験例4とほぼ同様にして調製した。ただし、一本鎖DNAは環状のまま固定した。実験例2に従って、1ウェル当たり、1 μg 、100 ng、10 ngのDNAを加えて固定化した。実験例3で示した方法に従って Bio-ATTGTAATGGGCTCTGTCCG をプローブとして各々のプレートのハイブリダイゼーション能を調べた。その結果は、図2に示される通りである (405 nm での吸光度の測定は、マイクロプレートリーダーで行った)。

【0043】実験例6

遺伝子増幅法による標識とその生成物の検出ならびに点突然変異の検出

ヒト β -グロビン遺伝子の検出を行うためにコドン2番

目から11番目に対応する遺伝子を化学合成し、プラスミド pUC f 1 の Hin c II 部位に挿入した (図3)。なお、正常な遺伝子 (β A) と β -サラセニアの原因である点突然変異遺伝子 (β S) の両方について同様の操作を行った。得られたクローンのうちセンス鎖の一本鎖DNAが得られるものを選び、一本鎖DNAを調製した。得られた一本鎖DNAは実験例2に従ってプレートに環状のまま固定した。

【0044】つぎに、遺伝子増幅反応を行った。反応は Cetus 社の GeneAmp (商標) を使用し、そのプロトコールに従った。プライマーは

5' ACACAACTGTGTGTTCACTAGC
とビオチン標識した

Bio-CAACTTCATCCACGTTCAACC
を用い、テンプレートとしては β -グロビン遺伝子の Pst I 消化により得られる 4.4 キロベース断片 (Hemo globin, 13, 657-670 (1989)) を使用した。

【0045】遺伝子増幅後、反応液の一部をとり、熱変性したのち実験例3と同様にしてハイブリダイゼーション検出を行った。結果は第3表に示される通りである

11

12

(測定値はマイクロプレートリーダーによる値である)。

*

第3表

	吸光度 (405nm)
β Aを固定したプレート	0. 432
β Sを固定したプレート	0. 288
β - グロビンを含まない	0. 037
DNAを固定したプレート	

【0047】実験例7

オリゴヌクレオチドの繰り返しを含む一本鎖DNAの調製

ヒトバビローマウイルス16のE7遺伝子の一部を化学合成し、図4に示す方法でその単位配列の繰り返しを含む一本鎖DNAを調製した。

【0048】まず、図4に示すようなオリゴヌクレオチド2種を化学合成し、その5'末端をポリヌクレオチドリソ酸化酵素とATPを用いてリソ酸化した。次にこの2種のオリゴヌクレオチドを混合して二本鎖を形成し、この二本鎖のフラグメント同士をT4DNAリガーゼを用いて結合させ、その後、大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenow断片と4種のデオキシヌクレオチド三リソ酸を用いて平滑末端とした。反応生成物を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、270塩基対に相当する部分を切りとてDNAを回収した。

【0049】次に、プラスミドpUC-Sf1×2(特開平2-190194号公報)を制限酵素BamHIで切断し、アルカリホスファターゼで5'末端のリソ酸を除去したものを調製した。これと、先にポリアクリルアミドゲルから回収したDNAをT4DNAリガーゼを用いて結合し、それを用いて大腸菌JM109を形質転換した。目的のクローンをプラスミド中のアンビシリン耐性選択マーカーによって選択し、得られたプラスミドpUC-Sf127×を制限酵素Sf1Iで切断し、電気泳動を用いて該配列の繰り返しを含む部分を精製、回収した。さらに、この断片をT4DNAリガーゼを用いて自己結合させ、プラスミドpUC119S(pUC119のBamHI切断部位にSf1Iリソカーネ(NEB社:#1138)を挿入したもの)の制限酵素Sf1I部位に挿入した。この自己結合の程度によって単位配列の数が異なるクローンが得られる。本実験では、挿入された単位配列の数が、9、14、64、165のクローンが得られた。

【0050】実験例8

オリゴヌクレオチドを繰り返し挿入したプローブの効果
実験例7で得られたクローンならびに別途調製した単位配列を1個持つクローンのそれぞれから、実験例1と同様にして一本鎖のDNAを調製し、実験例2と同様にしてマイクロプレートに固定した。

【0051】つぎに、以下に示すビオチン標識した2種のプライマー

Bi o - G C A A C C A G A G A C A A C T G A T C
Bi o - A T T G T A A T G G G C T C T G T C C G
を用い、バビローマウイルス16(HPV16)のE7遺伝子を含むプラスミドを錠型として以下のように遺伝子增幅反応を行った。

【0052】プラスミドpUPPHP16(実験例1参照)10ngとプライマー各100ngに、シータス社のGeneAmp(商標)の試薬をプロトコールに従って加え、反応液全量を100μlとした。反応液をパーキンエルマーシータス社のサーマルサイクラーで95℃で5分間加熱してDNAを変性させた後、これにAmpliTaq(商標)2.5単位を加え、72℃で60秒、94℃で30秒、50℃で30秒のサイクルを30回繰り返した。

【0053】この反応液の一部(水で10倍希釈したものの5μl)を熱変性し、実験例3に示す方法と同様の条件で、先に用意した、一本鎖DNAを固定したマイクロプレートを用いてハイブリダイゼーションを行い、吸光度を測定した。

【0054】得られた結果は図5に示される通りである。この図から明らかなように、単位配列が64個あるいは165個の場合、単位配列が1個の場合に比べておよそ20倍の感度であった。

【0055】実験例9

迅速簡易なヒトバビローマウイルス16遺伝子の検出

本法におけるハイブリダイゼーションをより簡易化するために、ハイブリダイゼーション溶液組成、ハイブリダイゼーション温度および発色時間の検討を行い、以下に示すような簡易化した条件でヒトバビローマウイルス16遺伝子の検出を行った。

【0056】陽性の試料としてカスキー細胞から抽出したDNA10ng、陰性の試料としてヒト末梢血から抽出したDNA10ngを錠型として実験例8と同様にしてPCR法により遺伝子增幅を行った。得られた反応液を、実験例8で調製した単位オリゴヌクレオチドの繰り返しが1の一本鎖DNAと繰り返しが64の一本鎖DNAを固定化したマイクロプレートにそれぞれ加え、ハイブリダイゼーションを行った。すなわち、一本鎖DNAを固定したプレートにハイブリダイゼーション溶液(5×SSC、0.2%SDS)100μlと上記PCR反応液5μlを加え、37℃で30分間ハイブリダイゼーションを行った後、ハイブリダイゼーション溶液を除去して、洗浄液(2×SSC)200μlで3回洗浄した。

【0057】これに、ストレプトアビシン-アルカリフオスファターゼ溶液 (B R L 社のストレプトアビシン-アルカリフオスファターゼを 0. 1 M Tris-HCl pH 7. 5、0. 3 M NaCl、2 mM MgCl₂、0. 05% (v/v) Triton X-100 で 1/1000 に希釈: 1.0 μl/ウェル) を加え、23℃で 10 分間振とうした。反応液を除き、洗浄液 (0. 1 M Tris-HCl pH 7. 5、0. 3 M NaCl、2 mM MgCl₂、0. 05% (v/v) Triton X-100: 2.00 μl/ウェル)

* エル) で 3 回洗浄した。洗浄後、p-ニトロフェニルリノ酸溶液 (1 M ジエタノールアミン pH 9. 8、0. 5 mM MgCl₂: 4 mg/ml: 1.00 μl/ウェル) を加えて 23℃で 20 分間反応し、405 nm で吸光度を測定した。その結果は、第 4 表に示される通りである。この表から明らかなように、操作法を簡易化しても単位配列が 64 挿入されたもので、有意に陽性と陰性を区別することが出来た。

【0058】

第4表

試料	単位オリゴスクレオチド	単位オリゴスクレオチド
陽性試料 (Caski 細胞由来)	0. 04	0. 73
陰性試料 (正常人由来)	0. 00	0. 02

* 数値は 405 nm の吸光度で基質によるバックグラウンドを差し引いたものである。

【0059】実験例 1.0

HLA-DRB 遺伝子の変異の検出

下記の 2 種のビオチン標識したプライマー [GLPDR B 1: HLA-DRB のアミノ酸 17 番目から 23 番目に相当、GAMPDR B 1: HLA-DRB のアミノ酸 87 番目から 94 番目に相当、J. Exp. Med., 169, 226-3-2267 (1989)]

B 1 o - T T C T T C A A T G G G A C G G A G C G
B 1 o - G C C G C T G C A C T G T G A A G C T C T C

を用いて、実験例 8 に示した方法と同様にして、ヒト末梢血より抽出した DNA 1 μg を鋳型として PCR により遺伝子増幅を行った。また、図 6 に示すような単位配列 (プローブ 1, 2 および 3) を、実験例 7 に示した方法と同様にして繰り返し結合し、プレートに固定した。プローブ 1 は遺伝子型 DR 4 に完全に相補的であり、プローブ 2 は遺伝子型 DR 4/DW 10 および DRW 13 ※

※ に完全に相補的である (図 6)。また、プローブ 3 は全ての遺伝子型に共通するものである。プローブ 1 および

プローブ 2 は単位オリゴスクレオチドが 50、プローブ

3 については単位オリゴスクレオチドが 10 のものを使

用した。

【0060】遺伝子増幅の反応サイクルは、94℃で 30 秒、50℃で 30 秒、72℃で 60 秒を 30 回繰り返した。得られた反応液 5 μl を、実験例 3 と同様にして、プローブ 1、プローブ 2 およびプローブ 3 を固定したプレートに加えてハイブリダイゼーション検出を行った。ただし、ハイブリダイゼーションは 60℃で 1 時間、発色は 23℃で 1 時間行った。

【0061】結果は第 5 表に示される通りである。プローブ 1、プローブ 2 はともに、配列に高い相同意があるとされる型に高い吸光度を示しており、この結果から本発明が HLA 遺伝子のタイピングに有効であることが示された。

【0062】

第5表

試料	遺伝子型	プローブ 1	プローブ 2	プローブ 3
1 DR 4/Dw 15, DR 9	7. 5 *	0. 12	10. 1 *	
2 DR 4/Dw 15	13. 7 *	0. 18	9. 0 *	
3 DRw 13, DRw 14	0. 35	6. 6 *	17. 8 *	
4 DR 9, DRw 13	1. 5	1. 5 *	10. 0 *	
5 DRw 8/Dw 8, 3, DR 9	6. 9	0. 17	12. 1 *	
6 DRw 14	0. 37	0. 19	18. 0 *	
7 DR 2	0. 67	1. 10	15. 3 *	

* : プローブが完全に相補的であると推定されるもの。

** : 数値は 405 nm の吸光度で基質によるバックグラウンドを差し引いたものであり、また吸光度 2 以上の場合は希釈して測定した値を原液の値に換算した。

【0063】

【配列表】

【0064】配列番号: 1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

50 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

15

配列の特徴

5'末端のAにスペーサーを介してビオチンが結合して*

配列

ATTGTAATGG GCTCTGTCCG

【0065】配列番号：2

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

ACACAACTGT GTGTTCACTA GC

【0066】配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CAACTTCATC CACGTTCAACC

【0067】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GCAACCAGCG ACAACTGATC

【0068】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TTCTTCAATG GGACGGAGCG

【0069】配列番号：6

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列...

GCCGCTGCAC TGTGAAGCTCG TC

【0070】配列番号：7

配列の長さ：40

配列の型：核酸

配列

CAGCTGAATT CGGATCCGTC GACGGATCCG AATTCACTG

【0071】配列番号：8

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

CACCTGACTC CTGAGGGAGAA GTCTGCCGTT

【0072】配列番号：9

配列の長さ：30

配列の型：核酸

16

*いる

16

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

20

10★配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

5'末端のCにスペーサーを介してビオチンが結合している

★

22

10★配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

5'末端のCにスペーサーを介してビオチンが結合している

★

20

☆配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

5'末端のGにスペーサーを介してビオチンが結合している

☆

20

◆配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

5'末端のTにスペーサーを介してビオチンが結合している

◆

20

*配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

5'末端のGにスペーサーを介してビオチンが結合している

*

22

※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

40

★鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

30

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：他の核酸 合成DNA

17

18

配列

CACCTGACTC CTGTGGAGAA GTCTGCCGTT

30

【0073】配列番号：10

配列の長さ：27

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGTATGAGC AATTAAATGA CAGCTCA

27

【0074】配列番号：11

配列の長さ：27

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACCTTGAGCT GTCATTTAAT TGCTCAT

27

【0075】配列番号：12

配列の長さ：300

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

★配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

配列の特徴

★ ヒト白血球抗原 (HLA) DR遺伝子の一部

配列

GGGGACACCC GACCACGTTT CTTGTGGCAG CTTAAGTTG AATGTCATT CTTCAATGGG	60
ACGGAGCGGG TCGGGTTGCT GGAAAGATGC ATCTATAACC AAGAGGGACTC CGTGGCGCTTC	120
GACAGCGACG TGGGGGAGTA CCGGGCGGTG ACGGAGCTGG CGCGCCCTGA TGCCGAGTAC	180
TGGAACAGCC AGAAGGACCT CCTGGAGCAC AGGGGGGCCG CGGTGGACAC CTACTGCAGA	240
CACAACTACG GGGTTGGTGA GAGCTTCACA GTGCAGCGGC GAGTTGAGCC TAAGGTGACT	300

【0076】配列番号：13

配列の長さ：300

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

☆配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

配列の特徴

☆ ヒト白血球抗原 (HLA) DR遺伝子の一部

配列

GGGGACACCC GACCACGTTT CTTGGAGCAG GTAAACATG AGTGTCAATT CTTCAACGGG	60
ACGGAGCGGG TGGGGTTCTT GGACAGATAC TTCTATCACC AAGAGGGACTA CGTGGCGCTTC	120
GACAGCGACG TGGGGGAGTA CCGGGCGGTG ACGGAGCTGG CGCGCCCTGA TGCCGAGTAC	180
TGGAACAGCC AGAAGGACCT CCTGGAGCAC AGGGGGGCCG CGGTGGACAC CTACTGCAGA	240
CACAACTACG GGGTTGGTGA GAGCTTCACA GTGCAGCGGC GAGTCTATCC TGAGGTGACT	300

【0077】配列番号：14

配列の長さ：300 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

◆起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

配列の特徴

ヒト白血球抗原 (HLA) DR遺伝子の一部

配列

GGGGACACCC GACCACGTTT CTTGGAGCAG GTAAACATG AGTGTCAATT CTTCAACGGG	60
ACGGAGCGGG TGGGGTTCTT GGACAGATAC TTCTATCACC AAGAGGGACTA CGTGGCGCTTC	120
GACAGCGACG TGGGGGAGTA CCGGGCGGTG ACGGAGCTGG CGCGCCCTGA TGCCGAGTAC	180
TGGAACAGCC AGAAGGACAT CCTGGAAGAC GAGGGGGCCG CGGTGGACAC CTACTGCAGA	240
CACAACTACG GGGTTGGTGA GAGCTTCACA GTGCAGCGGC GANNNNNNNNNNNNNNNNN	300

【0078】配列番号：15

配列の長さ：300

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

配列の特徴

50 ヒト白血球抗原 (HLA) DR遺伝子の一部

19

20

配列

GGGGACACCA GACCACGTTT CTTGGAGTAC TCTACGTC TG AGTGTCA TTT CTTCAATGGG 60
 ACGGAGCGGG TGCGGTTCCCT GGACAGATAAC TTCCATAACC AGGAGGAGAA CGTGCCTTC 120
 GACAGCGACG TGGGGGAGTT CCGGGCGGTG ACGGAGCTGG CGCGGCCTGA TGCCGAGTAC
 TGGAACAGCC AGAAGGACAT CCTGGAAGAC GACCGGGCGG CGGTGGACAC CTACTGCAGA
 CACAACATACG GGCTTGTTGGA GAGCTTCACA GTGCAGCGGC GAGTCCATCC TAAGGTGACT

【0079】配列番号：16

*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TACTTCTATC ACCAAGAGAA

20

【0080】配列番号：17

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：18

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAAGACCGAGC GGGCCGCG

18

【0081】配列番号：18

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：18

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGCAGACACA ACTACGGG

18

【図面の簡単な説明】

【図1】直鎖状一本鎖DNA調製のための改良ベクターの構築法ならびにその一本鎖DNAの調製法を示した図である。

【図2】マイクロプレートに固定した一本鎖DNAと二本鎖DNAのハイブリダイゼーション効率の比較結果を示した図である。

【図3】 β -サラセミアの点突然変異検出における固定化一本鎖DNA調製用ベクターへの挿入塩基配列を示し 30

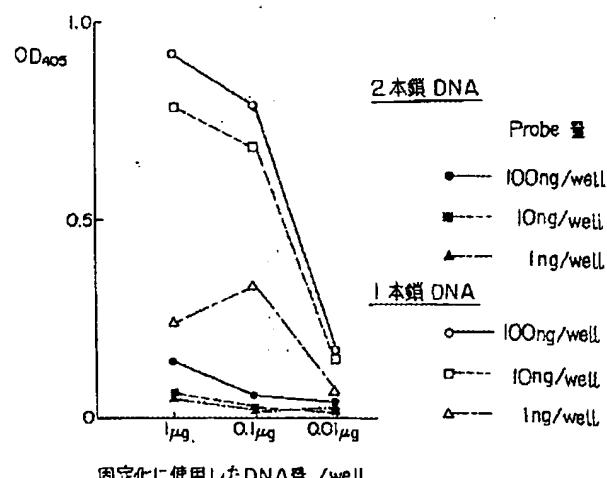
た図である。

【図4】ヒトパピローマウイルス16遺伝子に相補的な単位配列を繰り返し含んだプラスミドベクターの調製法を示したものである。

【図5】固定化したプローブの単位配列の数と感度の関係を示す図である。

【図6】HLA-D B遺伝子のそれぞれの型の配列ならびに本発明で使用したプローブの配列を示すものである。

【図2】

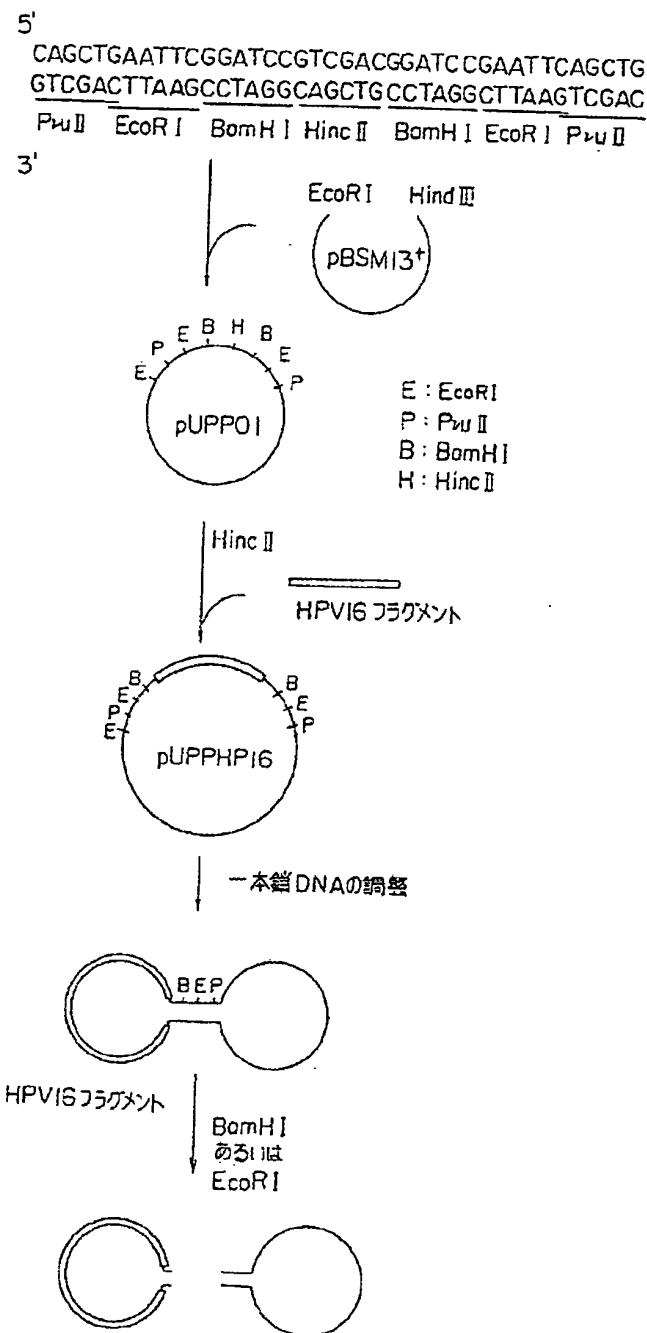


固定化に使用したDNA量 / well

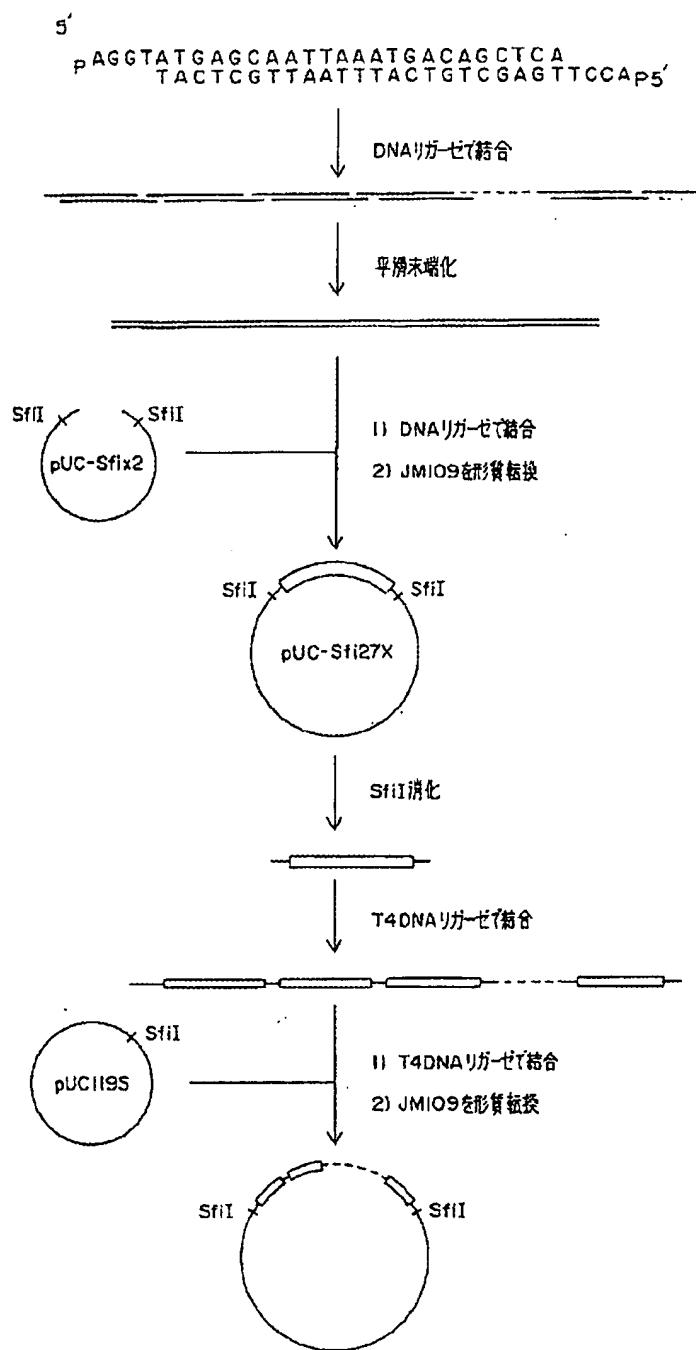
【図3】



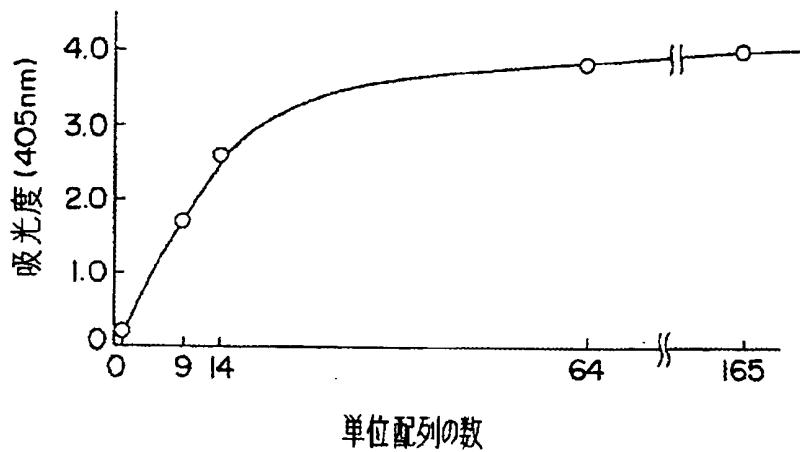
【図1】



【図4】



【図5】



【図6】

	1	10	20
DR1	GGGGACACCCGACCACTTCTTGTGCCAGCTTAAGTTGAATGTCATTCTCAATGGG		
DR4	-----GA---G---ACA---G-----C-----		
DR4/Dw10	-----GA---G---ACA---G-----C-----		
DRw13	-----A-----GA-T-CTC--C-C---G-----		
	30	40	
DR1	ACGGAGCCGGTGCCTGCTGAAAGATGCATCTATAACCAAGAGGAGTCCGTGCCCTTC		
DR4	-----C-----C-----A-T-----C-----A-----		
DR4/Dw10	-----C-----C-----A-T-----C-----A-----		
DRw13	-----C-----C-----A-T-----C-----G-----AA----- TACCTCTATCACCAAGAGGA		
	プローブ1		
	50	60	
DR1	GACACCCACGTGGGGACTACCGGGGGGTGACGGAGCTGGGGGGCTGATGCCAGTAC		
DR4	-----		
DR4/Dw10	-----		
DRw13	-----T-----		
	70	80	
DR1	TGGAAACACCCAGAAGGACCTCTGGACCAGACGGGGCCGGTGGACACCTACTGCAGA		
DR4	-----A-----		
DR4/Dw10	-----A-----AG-CGA-----		
DRw13	-----A-----AG-CGA----- GAAGACCGAGGGGGGGGGTGCA		
	プローブ2		
	90	100	
DR1	CACAACCTACGGGGTGGTGACAGCTTACAGTGCAGGGGGAGTTGACCTAACGTGACT		
DR4	-----CT-T-----G-----		
DR4/Dw13	-----TG-----*****		
DRw10	-----TG-----CC-T-----		
	CACAACCTACGGG		
	プローブ3		

--- は最上段とおなじ配列を示す

* は不明

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK 1000